



PATENT

(FW)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

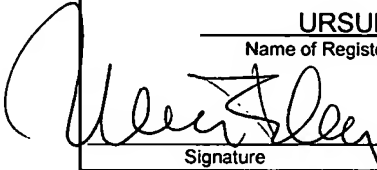
Docket No.: MORENO-LOPEZ

In re PATENT Application of:)
SONIA MORENO-LOPEZ &) Examiner: Anne Marie
MARCOS TIMÓN-JIMENEZ) Sabrina Wehbe
)
Appl. No.: 10/816,465) Group Art Unit: 1633
Filed: April 1, 2004) Confirmation No.: 8524
)
For: MEANS FOR ELICITING AN IMMUNE)
RESPONSE AND A METHOD THEREFOR)

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

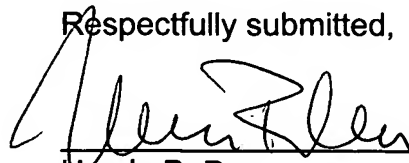
S I R:

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to "Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450", on <u>January 23, 2009</u> .	
(Date)	
URSULA B. DAY	
Name of Registered Representative	
	<u>Jan. 23 2009</u>
Signature	Date of Signature

Applicant submits a certified copy of the priority document 101 48 697.9 under 35 U.S.C. §119(a)-(d).

The Commissioner is hereby authorized to charge any fees which may be required, or credit any overpayment to Deposit Account No.: 06-0502.

Respectfully submitted,


Ursula B. Day
Attorney for Applicant
Reg. No. 47,296

Date: January 23, 2009
708 Third Avenue
Suite 1501
New York, N.Y. 10017
(212) 244-5500
UBD:be

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung DE 101 48 697.9 über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 48 697.9

Anmeldetag: 02. Oktober 2001

Anmelder/Inhaber: Mologen Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH, 14195 Berlin/DE

Bezeichnung: Mittel zur Verbesserung der Immunantwort

IPC: A 61 K 39/39, C 12 N 15/63, C 12 N 15/11

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der am 30. April 2003 eingereichten Unterlagen dieser Patentanmeldung, hinterlegt mit dem Prioritätsbeleg vom 02. Dezember 2002 bei der World Intellectual Property Organization.

München, den 13. März 2008
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Nitschke

Deutsches Patent- und Markenamt

München, den 13. März 2008

Telefon: (0 89) 21 95 - 2615

Fax Priorstelle: (0 89) 21 95 - 2650

Aktenzeichen: 101 48 697.9

Anmelder/Inhaber: Mologen Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH, 14195 Berlin/DE

Ihr Zeichen:

Deutsches Patent- und Markenamt · 80297 München

Bitte Aktenzeichen und Anmelder/Inhaber bei allen Eingaben und Zahlungen angeben!

Bescheinigung über Bearbeitungsdauer eines Prioritätsbeleges im Deutschen Patent- und Markenamt zur Vorlage für Anmeldung in

Mit dem Schreiben vom 07. März 2008 wurden von der Anwaltssozietät Hertin Prioritätsbelege zum Aktenzeichen DE 101 48 697.9 beantragt.

Die Prioritätsbelege konnten aufgrund besonderer umstände trotz mehrfacher Mahnungen und telefonischer Nachfragen durch den Antragssteller (Anwaltssozietät Hertin) vom Deutschen Patent- und Markenamt nicht fristgerecht gefertigt werden.

Es wird bestätigt, dass die verspätete Bearbeitung durch das Deutsche Patent- und Markenamt verursacht wurde.

Im Auftrag



Nitschke Nitschke

**Dokumentenannahme
und Nachbriefkasten
nur
Zweibrückenstraße 12**

Hauptgebäude:
Zweibrückenstraße 12

Markenabteilungen:
Cincinnatistraße 64
81534 München

Zweibrückenstr. 12 (Hauptgebäude):

S1 - S8 Haltestelle Isartor

Hausadresse (für Fracht):
Deutsches Patent- und Markenamt
Zweibrückenstraße 12
80331 München

Schwere-Reiter-Straße 37

Cincinnatistraße 64

Telefon: (089) 2195-0
Telefax: (089) 2195-2221
Internet: <http://www.dpma.de>

Zahlungsempfänger:
Bundeskasse Weiden
BBk München
Kto.Nr.: 700 010 54
BLZ: 700 000 00
BIC (SWIFT-Code): MARKDEF1700
IBAN: DE84 7000 0000 0070 0010 54





- 1 -

MOLOGEN Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH
Fabeckstr. 30
14195 Berlin

XI 628/01

Mittel zur Verbesserung der Immunantwort

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Verbesserung der Immunantwort durch Kopplung von transfervermittelnden Molekülen an Genexpressionskonstrukte, dessen Herstellung und nützliche Verwendungsmöglichkeiten.

Die Erfindung betrifft das Gebiet der genetischen Immunisierung.

- 5 Die genetische Immunisierung beruht auf dem Prinzip, daß nicht wie herkömmlich Antigene, sondern nur noch einzelne Expressionskonstrukte mit dem zu exprimierenden Genen geimpft werden. Diese kodieren für immunogene Proteine viraler, bakterieller oder parasitärer Erreger oder bei malignen Erkrankungen spezifisch exprimierter bzw. präsentierter Antigene. Dem Impfling wird somit lediglich die genetische Information zur Herstellung des fremden Proteins verabreicht, worauf die Körperzellen das fremde Protein selbst herstellen und anschließend gegen dieses körperfremde Protein eine effiziente Immunantwort ausgebildet wird.
- 10

Hintergrund der Erfindung

- 15 Der Schutz vor Infektionskrankheiten und auch das Prinzip der Immunisierung beruhen auf der Wiedererkennung von Strukturen von in der Vergangenheit erfolgreich bekämpften Erregern durch das Immunsystem.



- 2 -

Dabei werden zwei Hauptwege unterschieden: das humorale, welches auf der Synthese von Antikörpern durch B-Lymphozyten aber auch humoralen Komponenten der nicht-adaptiven Immunität, dem Komplementsystem beruht, und das zelluläre Immunsystem, welches auf der Aktivität von T-Lymphozyten, NK-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems beruht. T-Lymphozyten sind in der Lage, mit Viren infizierte Zellen zu erkennen. Man weiß heute, daß der zelluläre Arm des Immunsystems durch Aktivierung von sog. Typ- 1- Helferzellen und der humorale Arm durch Aktivierung von sog. Typ-2-Helferzellen induziert wird (Mosmann et al., J. Immunol. 1986, 136(10): 3561-6). Entsprechend wird der zelluläre Arm auch als TH1 pathway und der humorale Arm als TH2 pathway bezeichnet. Extrazellulär vorliegende Bakterien werden in der Regel durch den TH2 Arm bekämpft. Der TH2 Arm ist ebenso wichtig für die Neutralisierung von Bakteriengiften und für die Bekämpfung verschiedener Parasiten, die sich im extrazellulären Raum im Körper befinden.

Infektionserreger, die sich vor allem intrazellulär aufhalten, wie es für einzelne Bakterienarten und alle Viren bekannt ist, werden dagegen hauptsächlich durch den TH1 Arm, also durch zytotoxische Zellen, bekämpft.

Zum Einschleusen der immunogenen Antigene oder Teile davon kodierenden DNA ins Zellinnere sind verschiedene chemische, physikalische und biologische Transfektionsmethoden bekannt.

Biologische Mittel zur Transfektion, sog. Genfähren, sind virale Vektoren, Plasmide oder kovalent geschlossene DNA- Konstrukte (vgl. EP 0914 318 B1). Bei der in vivo wie auch der in vitro Transfektion stellt sich das Problem der effizienten sowie zielgerichteten Transfektion. Aus diesem Grunde wurde versucht, Transfektionsmethoden zu optimieren. Verschiedene Peptide und andere organische Moleküle wurden an die Genfähren über unterschiedliche Bindungsarten gekoppelt. Ebenso wurden durch Kopplung von Liganden die Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen zur verstärkten Aufnahme der Genfähren ausgenutzt (Fraser et al., 1998, Semin. Immunol., 10 (5): 363-72).

Durch kovalente Kopplung des Kernlokalisierungssignal (NLS) aus dem SV 40 Virus an für das Hepatitis small surface Antigen (HbsAg) kodierende Expressionskassetten konnte ein 10- bis 15-fach erhöhter Antikörpertiter nach intramuskulärer Applika-

- 3 -

tion nachgewiesen werden (Schlrmbeck et al., J. Mol Med. 2001 Jun;79 (5-6):343-50). Es wurde ein Unterschied in der Isotopenverteilung der Antikörperantwort gefunden mit einer starken Übergewichtung des Th2-spezifischen IgG1-Subtyps nach intradermaler Applikation mit partikelgebundener DNA („Gene-Gun2“) und einem
6 Übergewicht an Th1-spezifischem Subtyp IgG2A nach intradermaler Applikation. Es wurde kein Unterschied der Subtypenverteilung gefunden, der mit den Vektoren (Plasmid, minimalistischer Vektor) korrelierte.

Auch wurde das elf Aminosäuren lange T-Peptidfragment (YGRKKRRQRRR) des HIV-1 Genprodukts TAT verwendet, um 200nm große Liposomen in Zellen einzuschleusen. Die erfolgreichen Experimente verlangten jedoch eine Konzentration von
10 rund 500 T-Peptiden pro Liposom (Torchilin et al., PNAS 2001, 98(15): 8786-8791). Der Nachweis, dass es eine Membran-durchdringende Funktion aufweist, welche den Transport von Proteinen oder Peptiden in Zellen unterstützt, gelang Frankel (Frankel et al., 1988, Cell. 55: 1179-1188, Green et al., 1988, Cell. 55: 1179-1188,
15 US 5670617).

Es ist für die Impfung bzw. Immuntherapie verschiedener Krankheiten offenbar vorteilhaft, eine Th1-typische Immunreaktion zu erzeugen. Insbesondere gilt dies für intrazelluläre Parasiten wie Leishmania und Malaria, sowie virale Erkrankungen wie HIV. Jedes Mittel, welches die Ausprägung der Th2-Antwort nach Injektion von DNA verstärkt, ist in diesem Sinne vorteilhaft für die Erzeugung eines wirkungsvollen Impfschutzes.
20

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Mittel zur Verfügung zu stellen, welches eine pro Menge eingebrachter DNA-Expressionskonstrukte stärkere sowie zellulär vermittelte (Th1) Immunantwort erzeugt als die im Stand der Technik beschriebenen Mittel.

25 Gelöst wird die Aufgabe durch die unabhängigen Ansprüche.

Es wurde gefunden, dass durch die kovalente Bindung eines Peptides mit einer Proteintransduktionsdomäne oder einer Kernlokalisationsdomäne an die Haarnadelschleife der kovalent geschlossenen DNA Konstrukte (MIDGE ® genannt), die Effizienz der Transfektion von Zellen signifikant erhöht wird.

5

- 4 -

Es wurde das überraschende und nicht zu erwartende Ergebnis gefunden, dass das transduzierende Sequenzelement des TAT Peptides ein Nukleinsäurekonstrukt transportieren kann, welches um Größenordnungen größer ist als sein natürliches Substrat. Dieses Ergebnis war deswegen nicht zu erwarten, weil bisherige Untersuchungen nur mit wesentlich kleineren Molekülen einen Effekt zeigten. Dowdy et al. zeigten, dass die Fusion dieser Peptidsequenz an Proteinmoleküle ausreichend ist, um ein 120 kDalton großes Protein in Zellen zu transportieren (Dowdy et al. 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21 (2): 45-8). Es sollte daher überprüft werden, ob das von TAT abgeleitete T-Peptid auch in der Lage ist, nochmals erheblich größere DNA-Expressionskonstrukte zu transduzieren. Diese Annahme ist schon wegen der Molekülgröße (für ein 1800 bp großes Expressionskonstrukt liegt diese bei ca. 1,2 MDalton) sowie die vollkommen andere Molekülform weder trivial noch naheliegend. Während Proteine und Peptide nämlich allgemein in globulärer Form vorliegen, sind nicht topologisch gespannte DNA-Moleküle in erster Näherung als lineare Moleküle zu betrachten. Hinzu kommt für die Betrachtung ihrer Verschiedenheit von Proteinen noch die Oberflächenladung durch die Phosphatgruppen, die DNA zu einem stark negativ geladenen Molekül machen.

Ferner wurde aus dem Simian Virus SV-40 eine Peptidsequenz charakterisiert, welche ein Kern-Lokalisierungssignal (Nuclear Localization Signal = NLS) darstellt. Das Vorhandensein solcher Signalsequenzen, die für den Import von Proteinen in den Zellkern notwendig sind, sind aus mehreren Organismen bekannt. Moleküle, die größer als 60 kDa sind, können nur mit Hilfe einer Kern-Signalsequenz in den Zellkern transportiert werden. Speziell für das SV-40-NLS wurde gezeigt, dass Proteine bis zu 465 kDa zum Zellkern gesteuert werden (Lanford et al. 1986, Cell 15; 46 (4): 575-82). Diese Fähigkeit des Peptids wurde hier durch Kopplung an DNA für die Verbesserung des Gentransfers genutzt. Die verwendete Peptidsequenz ist PKKKRKV

Erfindungsgemäß ist ein Verfahren zur Herstellung derartiger Nukleinsäurekonstrukte zur Transkription von RNA-Molekülen in einer Zelle oder einem Zellverbund vorgesehen (beruhend auf der EP 0 941 318 B1), wobei das Nukleinsäurekonstrukt

6

- 6 -

- aus einem zirkulären Strang Desoxyribonukleinsäure mit einer teilweise zueinander komplementären, antiparallelen Basensequenz besteht, so dass ein hantelförmiges Konstrukt entsteht,
- wobei der zueinander komplementäre, antiparallele Basenabschnitt im wesentlichen aus einem Promotor, einem kodierendem Bereich und entweder einem Poly(A)-Additionssignal oder einer anderen RNA-stabilisierenden Sequenz besteht,
- und der nicht komplementäre Basenabschnitt zwei Schleifen ("Haarnadelschleifen") einzelsträngiger Desoxyribonukleinsäure bildet, die jeweils das 5'- und 3'-Ende des komplementären, antiparallelen Basenabschnitts kovalent miteinander verbinden,

besteht, wobei

- mit Hilfe wenigstens eines der folgenden Oligonukleotide (ODN 1 oder ODN 2)

ODN 1: 5'-PH-AGG GGT CCA GT XT TTC TGG AC

ODN 2: 5'-PH-GGG AGT CCA GT XT TTC TGG AC,

wobei X einen Aminosäurerest kennzeichnet,

die Haarnadelschleife ausgebildet wird,

- und mittels eines Crosslinkers wenigstens eine organische Molekülverbindung kovalent mit dieser Haarnadelschleife verbunden wird.

Dieses Verfahren ermöglicht die kovalente Bindung von Molekülen an die Nukleinsäurekonstrukte. Die kovalente Bindung ist aus den oben beschriebenen Gründen deutlich bevorzugt, da die Effektivität der Transfektion und damit auch letztlich der Transkription aufgrund der starken kovalenten Bindung erhöht ist.

7

- 6 -

Dankbar sind allerdings auch andere äquivalente Konstruktformulierungen.

Die Vorteile der Erfindung lassen sich mithin wie folgt zusammenfassen.

- Minimalistische Nukleinsäurekonstrukte werden so modifiziert, dass die Immunantwort verbessert wird.
- 5 • diese modifizierten minimalistischen Nukleinsäurekonstrukte führen eine verstärkt zellulär vermittelte Immunantwort herbei.

Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen beschrieben; die Erfindung wird anhand von Ausführungsbeispielen und der Figuren näher beschrieben.

10 Ausführungsbeispiele

1. Aktivierung der Oligodesoxyribonukleotide (ODN) zur Kopplung von Thiol-funktionalisierten Molekülen

Die Kopplung von Molekülen wie Peptiden, Zuckern oder anderen Naturstoffen ist generell über eine Vielzahl von chemischen Reaktionen denkbar. Es sind Standardreaktionen zur Herstellung von Amid-, Ester- oder Imidbindungen aus dem Repertoire der organischen Syntheschemie hinreichend bekannt. Zur konzeptionellen Überprüfung wurde hier die Reaktion einer Thiolgruppe, die am zu koppelnden Molekül vorhanden war, mit einer Maleinsäureimidgruppe am Nukleinsäuremolekül verwendet. Die Maleinimidgruppe wurde über die Reaktion eines bei der Synthese des ODN eingefügten Aminorests (mit X gekennzeichnet) mit einem kommerziell erhältlichen bifunktionalen Kopplungsreagenz über eine Transamidierung des im Kopplungsreagenz vorliegenden NHS-Carbonsäurederivats in die Nukleinsäurekomponente der Reaktion eingeführt. Es wurden zwei verschiedene ODN Sequenzen verwendet:

25 5'-PH-GGG AGT CCA GT XT TTC TGG AC (TIB-Molbiol, Berlin, Kurzbezeichnung: ODN 1), wobei PH für am 5'-OH phosphoryliert und X für Aminomodifikation Desoxyuracil steht

- 7 -

sowie

5'-PH-AGG GGT CCA GT XT TTC TGG AC (TIB-Molbiol, Berlin, Kurzbezeichnung: ODN 2).

Das aminomodifizierte ODN wurde wie folgt zur Kopplung umgesetzt:

- 5 Der Crosslinker zur kovalenten Bindung (hier: sulfo-KMUS N-(Maleimido)undecanoyloxy) sulfosuccinimid) in DMF, PIERCE Produkt-Nr. 21111) wird in vier gleichen Teilen im Abstand von 30 min zu den Amino-ODN (0,1 mM Endkonzentration) gegeben, bis eine Endkonzentration von 5 mM erreicht ist. Die Reaktion erfolgt für zwei Stunden in einem Crosslink-Kopplungspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 75 mM NaCl, pH 7,6) bei 37°C. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von Tris-HCl (pH 7,5; 50 mM Endkonzentration) gestoppt. Die aktivierten Amino-ODN werden Ethanol-präzipitiert (300 mM NaOAc pH 5,3; 20 mM MgCl₂; 2,5-faches Reaktionsvolumen 100 % Ethanol abs.) für 30 min bei -70°C. Das Präzipitat wird 30 min bei 15.000 rpm (4°C) zentrifugiert und unter gleichen Bedingungen für 15 min mit 70 % Ethanol gewaschen. Die aktivierten Amino-ODN werden abschließend in Wasser (MilliQ-Qualität) aufgenommen und bis zur Kopplung bei -20°C eingefroren.

2. Kopplung von T-Peptid an aktivierte Oligodesoxyribonukleotide (ODN)

- Die unter 1. beschriebenen aktivierten Amino-ODN werden in Kopplungspuffer (1x = 50 mM NaH₂PO₄, 75 mM NaCl, pH 7,0) aufgenommen, so dass sich eine 0,1 millimolare Endkonzentration ergibt. Anschließend wird das in Wasser gelöste T-Peptid mit der Sequenz YGRKKRRQRRRGGGC in 0,2 mM Endkonzentration zugegeben. Die Reaktion erfolgt für eine Stunde bei 37°C.

- Die Reinigung und Trennung der resultierenden Peptid-gekoppelten Oligodesoxyribonukleotide (T-ODN) von den nicht-gekoppelten ODN erfolgt mittels reversed phase HPLC. Die einzelnen Fraktionen werden gelelektrophoretisch analysiert. Die HPLC-Fraktion mit den T-ODN wird in der Vakuumzentrifuge eingedunstet und in MilliQ-Wasser aufgenommen. Die modifizierten ODN werden über eine Nukleosil-300 C18 Säule (10µm, 250mm Länge x 8mm Innendurchmesser) HPLC gereinigt. Der

9

- 8 -

Gradient verläuft von 0% Puffer A (100mM Ammoniumcarbonat) auf 42% Puffer B (80% Acetonitril) in 47min bei einer Flussrate von 2,4ml/min.

3. Kopplung von SV-40 NLS Peptid an aktivierte ODN

- Die unter 1. beschriebenen aktivierten Amino-ODN werden in Kopplungspuffer (1x = 50 mM NaHPO₄, 75 mM NaCl, pH 7,0) aufgenommen, so dass sich eine 0,1 millimolare Endkonzentration ergibt. Anschließend wird das in Wasser gelöste Peptid SV-40 NLS mit der Sequenz PKKKRKVEDPYC in 0,2 mM Endkonzentration zugegeben. Die Reaktion erfolgt bei 37 °C für eine Stunde.

- Die Reinigung und Trennung der resultierenden Peptid-gekoppelten ODN von den nicht gekoppelten ODN erfolgt mittels Reversed Phase-HPLC. Die einzelnen Reaktionen werden gelelektrophoretisch analysiert. Die HPLC-Fraktion mit den NLS-ODN wird in einer Vakuumzentrifuge eingengt und in Milliq-Wasser aufgenommen.

4. Herstellung von MIDGE - HbsAg T-Peptid

- MIDGE® (MINIMALISTIC IMMUNOLOGICALLY DEFINED GENE EXPRESSION VECTORS) sind Expressionskassetten, die aus dem CMV Promotor, einem Intron, der entsprechenden Gensequenz und einer Polyadenylierungssequenz bestehen. Die Konstrukte wurden wie folgt erhalten: das Plasmid pMOK HbsAg (TIB-Molbiol, Berlin) wurde mit Eco 311 vollständig verdaut. Die Ligation mit 5' phosphorylierten haarnadelförmigen ODN 2, an das das T-Peptid entsprechend 1. gekoppelt war, und ODN 1 erfolgte durch T4 DNA Ligase in Anwesenheit von Eco 311 und wurde durch Erhitzen auf 70 °C gestoppt. Das resultierende Gemisch wurde konzentriert und mit Eco 311 und T7 Polymerase in Abwesenheit von Desoxyribonukleotid-Triphosphaten behandelt. Die Aufreinigung erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie. Der Nachweis der erfolgreichen Kopplung der verschiedenen Liganden an die MIDGE erfolgte durch Restriktionsverdau. Durch gelelektrophoretischen Größenvergleich der vom MIDGE Vektor (mit BamHI bzw. EcoRI) abgeschnittenen ODN mit entsprechenden Kontroll-ODN wurde bestätigt, dass die Vektoren mit Peptide gekoppelt waren.

Die Herstellung von MIDGE-NLS erfolgte entsprechend.

- 9 -

Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in den Figuren 1, 2, 3 und 4 graphisch dargestellt. Dabei zeigt

Fig.1 ELISA für Gesamt-IgG-HbsAg-Bestimmung in Mäusen

5 Fig.2 ELISA für Gesamt-IgG-HbsAg-Bestimmung nach Boost mit 1µg DNA;

Fig. 3 Bestimmung der IgG Isotypen IgG 1 und IgG 2a.

Fig. 4 Verhältnis IgG 2a/IgG 1

HbsAg Antikörpertiterbestimmung in Mäusen

- 10 Es wurden für das Hepatitis-B-Oberflächenantigen kodierende MIDGE hergestellt. Der Nachweis der Expression erfolgte durch Antikörpertiterbestimmung gegen das Hepatitis B Antigen mittels ELISA. Die MIDGE-Herstellung erfolgte entsprechend Ausführungsbeispiel 4. Im Einzelnen wurden unmodifizierte MIDGE und MIDGE mit einem Liganden, nämlich Migde-NLS und MIDGE-T hergestellt. Als zusätzliche Kontrolle wurde das Plasmid pMOK HbsAg eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden die
- 15 Seren unbehandelter Mäuse benutzt.

- MIDGE (unmodifiziert sowie modifiziert) und Plasmid wurden in (Balb/c) Natriumphosphat pH 7,2 in einem Volumen von 50 µl intradermal in Mäuse injiziert. Die DNA-Mengen betrugen 10 µg bzw. 1µg pro Tier pro Impfung. Pro Gruppe wurden 5
- 20 Mäuse verwendet. Nach 11 Wochen erfolgte eine 2. Impfung (Boost). Die Antikörpertiterbestimmung aus Serum erfolgte nach Woche 2, 4 und 8. Die Ergebnisse sind in Fig. 1 dargestellt. Bei eingesetzten 10 µg DNA zeigt sich in der vierten Woche ein deutlicher Anstieg des Gesamt-Immunglobulin-G (IgG) Titers und damit die verstärkte Expression von HbsAg aller MIDGE Konstrukte gegenüber dem Plasmid. Den größten Effekt die modifizierten MIDGE. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Eingesetzte 1µg DNA führte zunächst zu keiner nennenswerten
- 25 Steigerung des HBsAg Titers in Woche 4 (Ergebnisse nicht gezeigt); jedoch zeigte sich überraschenderweise ein starker Anstieg des Titers nach dem Boost mit 1µg in

- 10 -

überraschenderweise ein starker Anstieg des Titers nach dem Boost mit 1 µg in Woche 11. Wiederum zeigen die modifizierten MIDGE den stärksten Effekt (siehe Figuren). Diese Ergebnisse zeigen, dass auch mit minimaler DNA Konzentration durch MIDGE ein hoher HbsAg Antikörpertiter erreicht wird. Auch hier ist der Vorteil der verbesserten Aufnahme der Expressionskonstrukte durch die Zellen und deren erfolgreicher Eintritt in den Zellkern von mit den Liganden gekoppelten MIDGE eindeutig sichtbar.

Diese Ergebnisse sind insofern sehr überraschend, da sie mit einer erheblich geringeren DNA-Menge erzielt werden konnten, als bisher für die Immunisierung mit nicht adjuvantierter DNA ohne partikuläre Formulierung in der Literatur beschrieben war. Für die Immunisierung mit HbsAg-kodierenden Genexpressionskonstrukten geht man allgemein von einer Menge von 30 - 100 µg Plasmid bei intramuskulärer oder intradermaaler Injektion aus (Schirmbeck et al., 1998, Vaccine, Vol.16, No.9/10: 949-954).

Die Ergebnisse werden anhand der Figuren im Detail nachfolgend beschrieben:

Fig.1 zeigt die Bestimmung des Gesamt IgG HbsAg Titers. Der Titer wurde mit mittels ELISA Verfahren bestimmt, wobei die Absorption in OD (Optische Dichte) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 406$ nm bestimmt wurde. Als Vergleich wurden Plasmid und unmodifizierter MIDGE eingesetzt. Die MIDGE mit den verschiedenen Kopplungen zeigen eine deutliche Erhöhung des Antikörpertiters, die auf eine verstärkte Expression des HbsAg hinweist. Dabei bedeutet:

pMOK:	Plasmid.
MIDGE:	unmodifizierter MIDGE
M-NLS:	MIDGE-NLS gekoppelt
M-TAT:	MIDGE mit T-Peptid gekoppelt

Fig.. 2 zeigt den Boosteffekt einer 2. Impfung mit 1 µg DNA nach 11 Wochen. Die bei der ersten Impfung und auch bei der zweiten Impfung eingesetzte DNA-Menge betrug 1 µg DNA. Auch hier zeigen die modifizierten MIDGE einen expressionsverstärkenden Effekt.

Fig. 3 zeigt die Bestimmung der IgG-Isotypen IgG 1 und IgG 2a. Überraschenderweise lösen mit dem T-Peptid und mit der NLS-Sequenz gekoppelte MIDGE eine nach der Antikörper-Isotypenverteilung, zytotoxischen Immunantwort (TH1) aus.

- Während der Präsentation von Antigen durch Antigen-Präsentierende Zellen (APC)
- 6 aus naiven T-Helferzellen kommt es bereits zu einer Prägung der T-Helferzellen in Richtung auf eine Th1 (zytotoxische) oder Th2 (humorale) Immunantwort. Bestimmend für diese Prägung ist u.a. das Zytokininmilieu, in dem die Interaktion zwischen APC und Helferzelle stattfindet, sowie die Art der an der Interaktion beteiligten Rezeptoren. (Pulendran et al., Science 193, 253-256, 2001).
- 10 Die Isotypenverteilung von Immunglobulin gamma (IgG) für ein bestimmtes Antigen spiegelt die Ausprägung der gesamten Immunantwort gegen dieses Antigen wieder. Dabei sind IgG -1 Subtypen charakteristisch für eine humorale Antwort, begleitet von einer verstärkten Ausschüttung von Interleukinen IL-4 und IL-10 durch aktivierte Lymphozyten; ein erhöhter Spiegel von Subtyp IgG 2a ist typisch für eine zelluläre
- 15 Th1-Antwort, begleitet von erhöhter Ausschüttung von IFNg und IL-12. Das Auftreten der Isotypen ist dabei nicht exklusiv, die relativen Titer können jedoch als Indikator für die dominante Art der entstandenen Immunantwort gewertet werden:

- Die intradermale Applikation von HbsAg-kodierenden Plasmiden führt typischerweise zu einer Th2 - typischen Immunantwort. Für eine Reihe medizinisch sehr relevanter Krankheiten ist allerdings die Erzeugung einer zytotoxischen Antwort wesentlich, hierzu gehören u.a. die Hepatiden, leukivirale Infektionen wie HIV sowie Infektionen mit intrazellulären Parasiten. Insofern ist die erfindungsgemäße Erzeugung einer Th1-dominanten Immunantwort durch Peptid-gekoppelte Genexpressionsvektoren nicht nur eine quantitative Verbesserung, weil mit weniger DNA ein höherer
- 20 Titer erreicht wird. Vielmehr handelt es sich um eine qualitative Verbesserung gegenüber dem Stand der Technik, die nach den aus der Literatur bekannten Daten keineswegs zu erwarten gewesen wäre.

- Der hinter dieser qualitativen Verschiebung stehende Mechanismus ist dabei z.Z. nicht geklärt. Die Tatsache, daß die Ligandenkopplung an die minimalistischen Expressionsvektoren zu einer Erhöhung der Reporter-Genexpression In-vitro führt (Ergebnisse nicht gezeigt), sagt nicht unbedingt eine erhöhte Immunisierung voraus,
- 30

- 12 -

noch weniger deren T_H Subtyp. Eine Verringerung der applizierten DNA-Menge sollte, wenn überhaupt eine Vorhersage getroffen werden könnte, nach derzeitigem Kenntnisstand durch die Verringerung der Adjuvans-Wirkung der zugeführten bakteriellen Immunstimulatorischen DNA-Motive zu einer $Th2$ - Antwort führen. Bei den

5 untersuchten Vektoren mit NLS- und T-Peptid ist das Gegenteil der Fall.

- 1 -

Patentansprüche

- 5 1. Arzneimittel zur Erzeugung einer Immunantwort, bestehend aus einem oder mehreren in eukaryoten Zellen operablen Genexpressionskonstrukten, welche ein oder mehrere Antigene unter Kontrolle einer Promotersequenz kodieren, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Oligopeptid mit dem Expressionskonstrukt kovalent verbunden ist.
- 10 2. Arzneimittel nach Anspruch 1, wobei das Oligopeptid eine Länge von fünf bis 25 Aminosäuren hat und mindestens die Hälfte der Aminosäuren zu der Gruppe Lysin oder Arginin gehören.
3. Arzneimittel nach Anspruch 1, wobei das Oligopeptid eine Kernlokalisationssequenz trägt.
- 15 4. Arzneimittel nach den Ansprüchen 1 bis 3, wobei das Oligopeptid die Sequenz PKKKRKV (Prolin-Lysin-Lysin-Lysin-Arginin-Lysin-Valin) enthält.
5. Arzneimittel nach den Ansprüchen 1 bis 3, wobei das Oligopeptid die Sequenz YGRKKRRQRRR enthält.
- 20 6. Arzneimittel nach den Ansprüchen 1 bis 5, wobei das Genexpressionskonstrukt ein linear-doppelsträngiges Desoxyribonukleinsäuremolekül ist, welches an beiden Enden des Doppelstrangs durch eine kurze Schleife einzelsträngiger Nukleosidreste kovalent geschlossen ist.
7. Verwendung des Arzneimittels nach Anspruch 1 bis 6 als Impfstoff.

- 1/3 -

Fig. 1

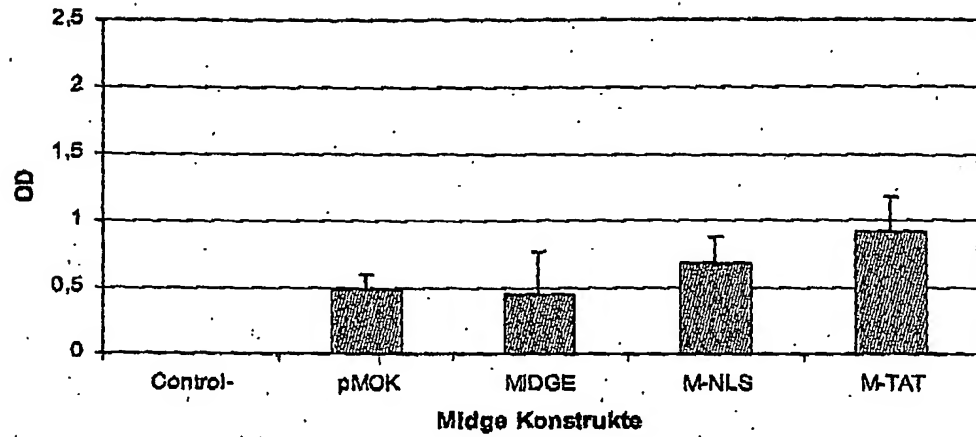
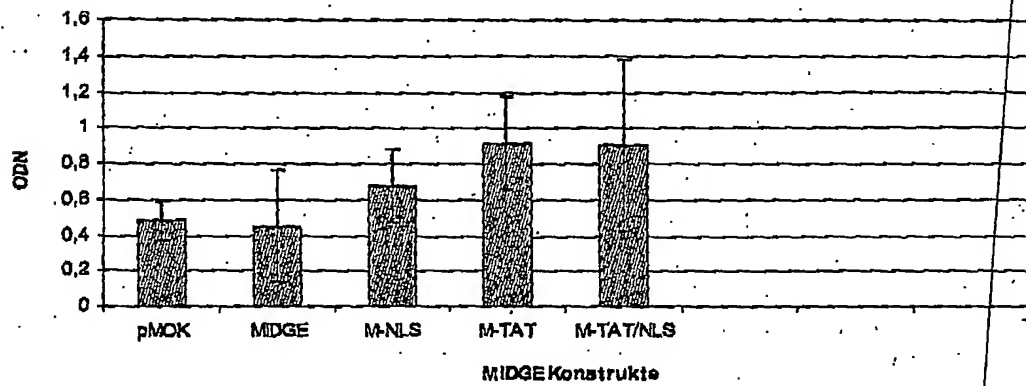


Fig. 2

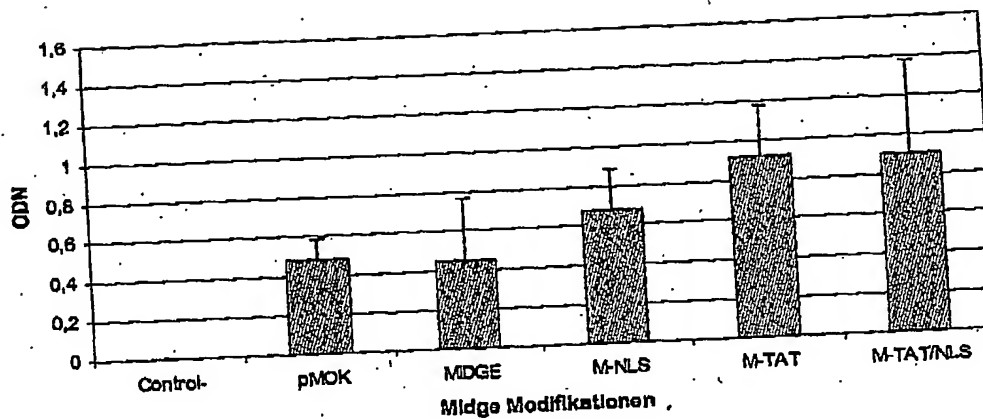


5

76

- 2 / 3 -

Fig. 3



17

- 3/3 -

Fig. 4

